

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02015/178490

発行日 平成29年4月20日 (2017. 4. 20)

(43) 国際公開日 平成27年11月26日 (2015. 11. 26)

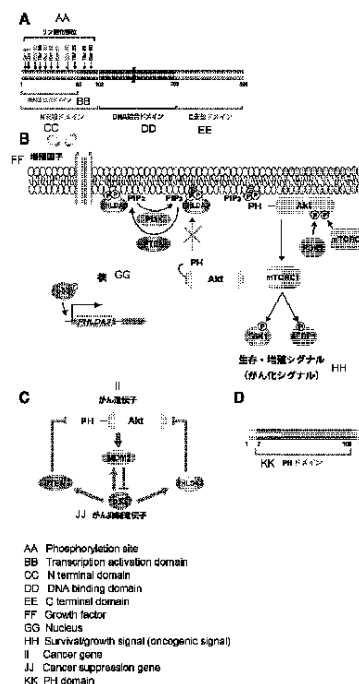
(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 L 27/38 (2006.01)	A 6 1 L 27/38 1 0 0	4 B 0 6 3
A 6 1 K 35/22 (2015.01)	A 6 1 K 35/22	4 B 0 6 5
A 6 1 K 35/407 (2015.01)	A 6 1 K 35/407	4 C 0 7 6
A 6 1 K 35/42 (2015.01)	A 6 1 K 35/42	4 C 0 8 1
A 6 1 K 35/34 (2015.01)	A 6 1 K 35/34	4 C 0 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 17 頁) 最終頁に続く		

出願番号 特願2016-521166 (P2016-521166)	(71) 出願人 504132272 国立大学法人京都大学 京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(21) 国際出願番号 PCT/JP2015/064792	
(22) 国際出願日 平成27年5月22日 (2015. 5. 22)	
(31) 優先権主張番号 特願2014-107529 (P2014-107529)	(71) 出願人 504157024 国立大学法人東北大学 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号
(32) 優先日 平成26年5月23日 (2014. 5. 23)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(71) 出願人 316010816 大木 理恵子 東京都中央区築地五丁目1番1号 国立がん研究センター研究所内
	(74) 代理人 110000796 特許業務法人三枝国際特許事務所
	(72) 発明者 角 昭一郎 京都府京都市左京区聖護院川原町53 国立大学法人京都大学再生医科学研究所内 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 移植材料及びその調製方法

(57) 【要約】

本発明は、臓器もしくは組織の細胞を含む移植材料の調製方法であって、前記細胞がPHLDA3の発現抑制下の細胞から構成されることを特徴とする、移植材料の調製方法を提供するものである。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

臓器もしくは組織の細胞を含む移植材料の調製方法であって、前記細胞がPHLDA3の発現抑制下の細胞から構成されることを特徴とする、移植材料の調製方法。

【請求項 2】

前記移植材料が腎臓、肝臓、肺、心臓、小腸、膵臓または膵島の移植材料である、請求項 1 に記載の移植材料の調製方法。

【請求項 3】

移植材料を構成する細胞がMEN1の機能を保持している、請求項 1 又は 2 に記載の移植材料の調製方法。

10

【請求項 4】

移植材料の調製をPHLDA3の発現又は機能を抑制する物質の作用下に行うことを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の移植材料の調製方法。

【請求項 5】

PHLDA3の発現抑制剤がPHLDA3のsiRNAであり、PHLDA3のsiRNAを細胞内に導入して移植材料の調製を行う、請求項 4 に記載の移植材料の調製方法。

【請求項 6】

ジェノタイプがPHLDA3(-/-)またはPHLDA3(+/-)の細胞を用いて移植材料を調製することを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の移植材料の調製方法。

20

【請求項 7】

細胞が生体適合性のカプセルに封入されている、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の移植材料の調製方法。

【請求項 8】

臓器又は組織の細胞から構成される移植材料であって、細胞のジェノタイプがPHLDA3(-/-)またはPHLDA3(+/-)である、移植材料。

【請求項 9】

非ヒト哺乳動物由来である請求項 8 に記載の移植材料。

【請求項 10】

移植材料が膵島である、請求項 8 又は 9 に記載の移植材料。

【請求項 11】

PHLDA3抑制剤を含む糖尿病治療薬。

30

【請求項 12】

PHLDA3プロモーターの制御下にレポーター遺伝子を含む発現ベクターを導入した細胞に候補物質を作用させ、レポーター遺伝子の発現量を低下させる候補物質を選択することを特徴とする、糖尿病治療薬のスクリーニング方法。

【請求項 13】

PHLDA3の発現又は機能を抑制する物質を有効成分とする移植効率向上剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、移植材料およびその調製方法、糖尿病治療薬並びに糖尿病治療薬のスクリーニング方法に関する。

40

【0002】

また、本発明は、移植効率向上剤に関する。

【背景技術】

【0003】

糖尿病患者の治療として、膵臓移植より患者の体への負担が少ないという事で膵島移植が行われている。

【0004】

膵島移植の際の最大の課題は、未だ低率の移植成績を向上させる事にあるが、現行の膵

50

島分離法では、100%の膵島を確保する事は不可能である。加えて、膵島分離過程による障害や、分離膵島が無血管状態となり虚血にさらされる事などの理由から膵島のアポトーシスが誘導され、分離後よりその数は減少し、インスリン分泌能は著しく低下する。さらに、移植後（現行の方法では門脈内に直接投与する）には、血液凝固反応などによって惹起される炎症反応物質・細胞の影響や膵島自身が末梢門脈を塞栓する事で移植部位の虚血が助長される事により、移植した膵島の大部分が早期に失われる。この現象は、膵島に限らず全ての移植材料に適用でき、移植材料を保護し、その機能を維持することが求められている。

【0005】

膵島保護のためにEIF-5A1の遺伝子発現をsiRNAにより抑制することが提案されているが（特許文献1）、この方法ではその効果の程度や持続時間が共に限定的であった。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】W02009/026317

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、移植材料を調製する過程での移植細胞のアポトーシスを抑制し、高いレベルで機能を保持することを主な目的とする。

20

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者は上記課題に鑑み研究を重ねた結果、PHLDA3の発現を抑制することで膵島細胞を含む臓器、組織の細胞のアポトーシスを抑制し、機能を維持し、優れた移植材料が得られることを見出した。

【0009】

本発明は、以下の移植材料およびその調製方法、糖尿病治療薬、スクリーニング方法および移植効率向上剤を提供するものである。

項1．臓器もしくは組織の細胞を含む移植材料の調製方法であって、前記細胞がPHLDA3の発現抑制下の細胞から構成されることを特徴とする、移植材料の調製方法。

30

項2．前記移植材料が腎臓、肝臓、肺、心臓、小腸、膵臓または膵島の移植材料である、項1に記載の移植材料の調製方法。

項3．移植材料を構成する細胞がMEN1の機能を保持している、項1又は2に記載の移植材料の調製方法。

項4．移植材料の調製をPHLDA3の発現又は機能を抑制する物質の作用下に行うことを特徴とする項1～3のいずれかに記載の移植材料の調製方法。

項5．PHLDA3の発現抑制剤がPHLDA3のsiRNAであり、PHLDA3のsiRNAを細胞内に導入して移植材料の調製を行う、項4に記載の移植材料の調製方法。

項6．ジェノタイプがPHLDA3(-/-)またはPHLDA3(+/-)の細胞を用いて移植材料を調製することを特徴とする、項1～3のいずれかに記載の移植材料の調製方法。

40

項7．細胞が生体適合性のカプセルに封入されている、項1～6のいずれかに記載の移植材料の調製方法。

項8．臓器又は組織の細胞から構成される移植材料であって、細胞のジェノタイプがPHLDA3(-/-)またはPHLDA3(+/-)である、移植材料。

項9．非ヒト哺乳動物由来である項8に記載の移植材料。

項10．移植材料が膵島である、項8又は9に記載の移植材料。

項11．PHLDA3抑制剤を含む糖尿病治療薬。

項12．PHLDA3プロモーターの制御下にレポーター遺伝子を含む発現ベクターを導入した細胞に候補物質を作用させ、レポーター遺伝子の発現量を低下させる候補物質を選択す

50

ることを特徴とする、糖尿病治療薬のスクリーニング方法。

項 1 3 . PHLDA3の発現又は機能を抑制する物質を有効成分とする移植効率向上剤。

【発明の効果】

【0010】

移植材料の細胞のアポトーシスを促進するPHLDA3遺伝子のノックダウン又はノックアウトにより脆弱な細胞の強靱化がはかれる。また、PHLDA3遺伝子のジェノタイプが(-/-)または(+/-)である動物においては膵島の肥大・増生が起こり、非常に高い収率の膵島分離が可能となる。

【0011】

2型が悪化してインスリン依存性になった場合でも、PHLDA3を抑制することで細胞機能の再生が起こり、糖尿病が治療できる。自己免疫が関与する1型糖尿病や移植後の免疫拒絶を回避するためには、免疫抑制やカプセル化による免疫隔離を行うことが好ましい。

10

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】A) p53の構造とN末端転写活性化ドメイン内のリン酸化部位。B) Akt/mTOR経路とPHLDA3によるAkt抑制機構。PHLDA3はあたかもAktのドミナントネガティブ体のように機能し、Akt活性化を抑制する。C) がん遺伝子Aktとがん抑制遺伝子p53は互いに制御し合い、Akt/p53ネットワークを形成している。p53の新規標的遺伝子PHLDA3もまたAkt経路を抑制するがん抑制遺伝子である。D) PHLDA3の構造。

【図2】A) PHLDA3野生型のマウスとPHLDA3欠損マウスの膵島のヘマトキシリン・エオジン染色。B) PHLDA3野生型のマウスとPHLDA3欠損マウスの膵島の細胞(インスリン陽性)と細胞(グルカゴン陽性)の分布。

20

【図3】A) Akt活性とAktの下流シグナル因子をウエスタンブロット法で検出した。各因子の活性は、 α -アクチンを基準に数値化している。B) PHLDA3野生型のマウスとPHLDA3欠損マウスの膵島。各マウスの膵島細胞の面積を算出し、グラフに示した。C) ストレプトゾトシン(STZ)誘導性の糖尿病マウスにおける血中グルコース濃度。D) STZ投与したPHLDA3野生型のマウスとPHLDA3欠損マウスの膵島の細胞(インスリン陽性)と細胞(グルカゴン陽性)を検出した。

【図4】膵島細胞におけるPHLDA3発現のAkt活性、細胞増殖及びアポトーシスに及ぼす効果。(A) MIN6細胞におけるPHLDA3発現のAkt活性に対する効果。MIN6細胞は35の感染多重度でAd-LacZ又はAd-PHLDA3で形質導入し、感染の30時間後に収穫した。Akt活性化及びAkt下流シグナリング分子のリン酸化をウエスタンブロットティング及び総Aktレベルに対する標準化(P-Akt)または α -アクチンレベルにより定量化した(P-p70 S6K, P-S6, P-Mdm2)。(B及びC) RIN細胞におけるPHLDA3発現のsiRNA抑制の有効性。RIN細胞はコントロール又はPHLDA3 siRNAによりトランスフェクトされた。PHLDA3 mRNAレベルはトランスフェクトの31時間後に定量RT-PCRにより分析し、 α -アクチンに対して標準化した(B)。未処理に対し γ 線照射(20 Gy)に供した細胞を用いてPHLDA3タンパク質レベルを感染48時間後にウエスタンブロットティングにより測定した(C)。 γ 線照射したサンプルは、PHLDA3タンパク質を発現するバンドを同定するために含めた(PHLDA3はp53活性化により誘導される)。(D) RIN細胞におけるPHLDA3発現のAkt活性化に対する効果。RIN細胞は(B)と同様にトランスフェクトし、Akt活性化を感染31時間後にウエスタンブロットティングにより測定し(左)、総Aktレベルに対する標準化により定量化した(右)。(E) RIN細胞増殖に対するPHLDA3発現の効果。RIN細胞は(B)と同様にトランスフェクトし、BrdUで3h標識され、トランスフェクトの28時間後に収穫した。BrdU陽性細胞をZiva Ultrasensitive BrdUアッセイにより定量化した。(F)初代膵島細胞におけるPHLDA3発現のsiRNA抑制。単離された初代膵島細胞をコントロール又はPHLDA3 siRNAによりトランスフェクトし、30時間後に収穫し、PHLDA3 mRNAレベルを定量RT-PCRにより(B)と同様に分析した。(G)初代膵島細胞におけるPHLDA3発現のAkt活性化に対する効果。細胞は(F)と同様にsiRNAでトランスフェクトされ、トランスフェクトの48h後にグルコース(30 mM)で20分間処理した。Akt活性化のレベルを(D)と同様に分析した。(H)初代膵島細胞増殖に対するPHLDA3発現の効果。細胞は(F)と同様にト

30

40

50

ランスフェクトされ、BrdUで4 h標識され、トランスフェクトの30 h後に収穫した。BrdU陽性細胞は(E)と同様に分析した。(I及びJ)初代ラット膵島のSTZ-誘導アポトーシスに対するPHLDA3発現の効果。単離した膵島を3匹のラットからプールし、コントロール又はPHLDA3 siRNAによりトランスフェクトした。トランスフェクトの75 h後に膵島をSTZ (20 µg/mL)で30分間処理した。膵島を次いで終夜培養し、総RNAを調製し、PHLDA3発現を定量RT-PCRにより(B)と同様に分析し(I), またはTUNEL 染色とFACS分析に供した(J)。

【図5】PHLDA3 肝臓内膵島移植データ 150 IEQs移植

【発明を実施するための形態】

【0013】

PHLDA3は、p53(図1A)の標的遺伝子であり、127のアミノ酸からなるタンパク質をコードする。PHLDA3 タンパク質は、PIP₂ やPIP₃ との結合に働くPH ドメインのみから構成され、PHLDA3 タンパク質がAkt とPIP₃ の結合を競合的に阻害し、p53 によるAkt 活性抑制経路を担っている(図1 B、C)。

【0014】

本発明において使用するPHLDA3のデータベースのアクセッション番号は、各々ヒトPHLDA3 (Hs00385313_m1)、マウスPHLDA3 (Mm00449846_m1)、ラットPHLDA3 (Rn01483684_m1)である。これら以外の哺乳動物のPHLDA3の塩基配列およびアミノ酸配列は同様にデータベースに登録されている。

【0015】

PHLDA3はがん抑制遺伝子であるが、本発明者はPHLDA3 ノックアウトマウスにおいて膵内分泌腫瘍(NET)は発生せず、PHLDA3とMEN1が同時に欠損又は大幅な機能低下した場合にのみ膵内分泌腫瘍が生じることを確認した。従って、PHLDA3がノックダウンされた膵島移植材料あるいはPHLDA3がノックアウトされた哺乳動物由来の膵島移植材料は、がん化のおそれではなく、移植材料として好適に用いることができる。膵島細胞のPHLDA3のジェノタイプはヘテロ型(+/-)あるいは変異ホモ型(-/-)のいずれでもよく、いずれも膵島の過形成、インスリン分泌の亢進が生じ得る。PHLDA3のヘテロ型(+/-)の膵島/膵島細胞は、膵島細胞の機能、増殖能は十分高く、かつ、MEN1遺伝子の欠損又は大幅な機能低下を生じた場合であっても膵内分泌腫瘍(NET)は生じないため好ましい移植材料である。

【0016】

文献(Mamm Genome. 1999 Dec;10(12):1150-9)は、Tih1 (PHLDA3の別名)が多くの臓器、組織で発現することを開示しており、PHLDA3は膵島細胞のみではなく、多くの臓器、組織で同様に機能していることが推測される。従って、PHLDA3のジェノタイプをヘテロ型(+/-)あるいは変異ホモ型(-/-)とするか、或いは膵島以外の臓器・組織についてPHLDA3タンパク質の阻害剤を作用させることで移植用の臓器、組織の細胞のアポトーシスを抑制でき、移植材料の調製時における機能低下を軽減ないし阻止できる。移植用の臓器、組織としては腎臓、肝臓、肺、心臓、小腸、膵臓、膵島などが挙げられる。

【0017】

PHLDA3タンパク質の発現又は機能の阻害剤は、移植細胞の機能を高め、アポトーシスを抑制するので、移植効率向上剤として有用である。

【0018】

好ましい移植材料は膵島であるので、以下は膵島を中心に説明するが膵島以外の臓器・組織の移植材料についても同様である。

【0019】

膵島細胞は、臓器移植用の膵臓から分離されてもよく、ES細胞あるいはiPS細胞などの膵島細胞に分化可能な幹細胞から分化誘導して調製してもよい。ES細胞あるいはiPS細胞はPHLDA3をノックアウトしてもよく、膵島細胞への分化の過程でPHLDA3をノックダウンしてもよい。同様に膵臓から膵島移植材料を調製する場合、PHLDA3をノックダウンしてもよい。さらに、PHLDA3はヘテロ型(+/-)であっても膵島の過形成が生じ(図3A)、膵島細胞の増殖能の亢進、アポトーシスの抑制、インスリン分泌能の向上などの効果はノックダウンと同様に十分に有効である。膵島移植材料は、ヒトの膵臓から調製できるが、PHLDA3のジ

10

20

30

40

50

ェノタイプはヘテロ型 (+/-) あるいは変異ホモ型 (-/-) の非ヒト哺乳動物(ブタが好ましい)の肥大化した膵島を移植材料として利用することができる。

【0020】

PHLDA3のノックダウンは、siRNA、shRNA、マイクロRNAなどのRNAiを利用して行ってもよく、PHLDA3の阻害剤を膵島細胞に作用させてもよい。

【0021】

膵臓からの膵島の分離は、常法に従い行うことができ、例えばコラゲナーゼ灌流液などにより膵臓を処理し、膵島を含む処理物を遠心分離することで行うことができる。PHLDA3のノックダウンは、膵島を分離後に行えばよい。PHLDA3のsiRNAなどは、例えばリポフェクタミン2000などの細胞導入剤を用いて膵島細胞内に導入することができる。膵島移植材料はアルブミンなどを共存させてもよく、冷蔵保存される。

10

【0022】

膵島細胞の由来は哺乳動物であれば特に限定されない。哺乳動物としては、ヒト、ウシ、ウマ、ブタ、マウス、ラット、ハムスター、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、サルなどが挙げられる。たとえばヒトに膵島移植を行う場合、ヒト由来の膵島が好ましいがブタ膵島などの非ヒト哺乳動物由来の膵島をヒトに移植することもできる。

【0023】

膵島移植材料は、膵島細胞のみで構成されてもよく、膵島細胞と生体適合性材料を共存させてもよい。生体適合性材料としては、コラーゲン、接着分子(ラミニン、フィブロネクチン、ナイドジェン)、エラスチン類、プロテオグリカン類、ヒアルロン酸類、グリコサミノグリカン鎖、キトサン、アルギン酸塩、生分解性ポリマー(ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリカプロラクタムなど)、さらにポリビニルアルコール(PVA)、ハイドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)、カルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC-Na)、ハイドロキシエチルセルロース(HEC)などのセルロース誘導體、アガロース、デンプン、デキストラン、プルランなどの多糖及びその誘導體、カルボキシビニルポリマー、ポリエチレンオキサイド、ポリ(メタ)アクリルアミド、ポリ(メタ)アクリル酸等のホモポリマー、或いはこれらと多糖などとの共重合体、混合物及び他のモノマーの共重合体、アルギン酸などのポリアニオンとポリ-L-リジンなどのポリカチオンとのポリイオンコンプレックス膜などが挙げられる。本発明の膵島移植材料は、生体適合性材料によりカプセル化されていてもよい。

20

30

【0024】

さらに本発明は、糖尿病治療薬の新しいスクリーニング方法を提供する。具体的には、PHLDA3プロモーターの制御下にレポーター遺伝子を連結した発現ベクターを細胞内に導入し、当該細胞に薬物の候補物質を作用させ、レポーター遺伝子の発現量を低下させる、すなわちPHLDA3の発現を抑制する候補物質を選抜する。PHLDA3の発現を抑制する薬物候補物質は膵島/膵島細胞の増殖、インスリン産生および分泌を増大させることで糖尿病治療薬として有用である。

【0025】

本発明のスクリーニングに用いる細胞は、細菌などの原核細胞、酵母、植物細胞、動物細胞などの真核細胞のいずれでもよいが、真核細胞が好ましく、動物細胞がより好ましい。動物細胞としては、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、サル、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタなどの哺乳類、ニワトリ、アヒルなどの鳥類、カエルなどの両生類、イモリなどの爬虫類、魚介類、昆虫のいずれの細胞でもよく、哺乳類細胞が好ましく、ヒト細胞が最も好ましい。

40

【0026】

レポーターとしては、lacZ、ルシフェラーゼ(ウミボタル、ホタル、ウミシイタケ、オワンクラゲ、エクオリン)、GFP, YFP, BFP, CFP、DsREDまたはRFPなどの蛍光タンパク質、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼなどが挙げられる。

【0027】

50

前記細胞は、プロモーターの他に、エンハンサー、転写終結因子、タンパク質コード遺伝子の前の開始コドン(ATG)、イントロンのスプライシングシグナル、終止コドンを含むことができる。

【0028】

PHLDA3遺伝子発現の抑制は、siRNAなどの核酸を用いて行ってもよい。また、糖尿病治療は、PHLDA3タンパク質の機能阻害剤を用いて行ってもよい。PHLDA3タンパク質はAktとPIP₃の結合を競合的に阻害するので、PHLDA3存在下におけるAktとPIP₃の結合を促進する物質のスクリーニングを行うことにより糖尿病治療薬を得ることができる。

【0029】

PHLDA3タンパク質阻害剤を糖尿病患者に投与すると膵島を再生することができる。さらに、膵臓摘出時に臓器保存液中にPHLDA3タンパク質阻害剤を含ませておき、分離操作中や移植時まで持続的に作用させておけば膵島細胞のアポトーシスが抑制できる。

【実施例】

【0030】

本発明を以下の代表的な実施例によって詳細に説明するが、本発明の範囲は以下に例示される実施態様に限定されるものではない。

【0031】

実施例1：PHLDA3の膵島に対する作用

PHLDA3遺伝子欠損(+/-、-/-)マウスを論文(Frank D, et al. (2002) Placental overgrowth in mice lacking the imprinted gene Ipl. Proc Natl Acad Sci USA 99(11):7490 - 7495.)に従い得た。これらのPHLDA3遺伝子欠損(+/-、-/-)マウスでは膵島の過形成が観察された(図2A)。

【0032】

そこで、本発明者らは、過形成を起こした膵島がどのような細胞により構成されているのかを調べた。膵島は主に、インスリンを産生する細胞と、それを取り囲みグルカゴンを産生する細胞から構成される。これら糖代謝に関わるホルモンを認識する抗体を用いて膵島を免疫染色すると、PHLDA3遺伝子欠損マウスの膵島では、野生型マウスに比べてインスリン陽性の細胞の異常増殖が起きていることがわかった(図2B)。PHLDA3欠損マウスから単離した膵島ではAktのリン酸化とそれに伴うAktの下流因子のリン酸化(S6Kとその基質であるS6、またGsk3やMdm2のリン酸化)が観察され、Akt/mTOR経路の活性化が確認された(図3A)。また、PHLDA3遺伝子欠損マウスにおいて膵島細胞の肥大が観察された(図3B)。さらに我々は、インスリンを産生する細胞特異的にアポトーシスを誘導するストレプトゾトシン(STZ)をPHLDA3遺伝子野生型および欠損マウスに投与した。STZを投与したマウスにおける細胞のアポトーシスは、血中のグルコース濃度の上昇を指標として検出する。STZ投与後のPHLDA3遺伝子欠損マウスの血中グルコース濃度は、野生型マウスに比べて有意に低く(図3C)、PHLDA3遺伝子欠損マウスにおいては細胞の減少が抑制されており(図3D)、PHLDA3遺伝子欠損細胞がアポトーシス抵抗性になっている事が示された。

【0033】

これらの結果から、PHLDA3を抑制することで膵島を保護し、糖尿病を治療できることが明らかになった。

【0034】

また、PHLDA3遺伝子部分欠損(+/-)マウスは完全欠損(-/-)マウスと同様な膵島細胞に対する作用が観察され、PHLDA3はノックアウトする必要はなく、発現量を少し低下させ(ノックダウン)、がん化のリスクなしに糖尿病治療が可能であることが実証された。

【0035】

実施例2：膵島細胞のsiRNAによるノックダウンの効果

膵NETは膵島分泌細胞由来である。膵島細胞におけるPHLDA3の機能を分析するために、膵臓細胞由来の細胞株であるRIN細胞及びMIN6細胞を調べた(図4A-4E)。RIN細胞は検出可能なレベルのPHLDA3発現を有するが、MIN6は非常に低いレベルのPHLDA3発現しか示

10

20

30

40

50

さなかった。本発明者は最初に機能獲得アプローチを使用してPHLDA3がMIN6細胞におけるAktのリプレッサーとして機能することを確認した。図4Aに示されるように、PHLDA3の発現はAkt活性化レベルの低下とAkt下流のシグナリング分子のリン酸化の減少をもたらす。同様な結果は、PHLDA3^{-/-}マウス胎児線維芽細胞を用いても得られた。次に、本発明者はPHLDA3に対するsiRNAを用いてRIN細胞におけるPHLDA3発現のノックダウンを行い(図4B及び4C)、増大したAkt活性化と細胞増殖を確認した(図4D及び4E)。本発明者は正常な初代ラット膵島細胞を用いて同様な結果を得た。すなわち、PHLDA3発現のノックダウンはグルコース刺激の存在下及び非存在下でAkt活性化と有意な細胞増殖促進を生じた(図4F-4H)。次に、本発明者はインスリン産生細胞特異的な毒性を示すストレプトゾトシン(STZ)により誘発された膵島細胞のアポトーシスに対するPHLDA3発現の効果を分析した。siRNAによるPHLDA3発現の抑制は単離されたラット膵島においてあまり強くなかったが(図4I)、このノックダウンはSTZ処理によるアポトーシス細胞数を有意に減少した(図4J)。これらの結果は、PHLDA3のノックダウンが膵島細胞の増殖を促進し、アポトーシスを抑制することを実証する。

10

20

30

40

50

【0036】

実施例3：肝臓内膵島移植

PHLDA3遺伝子はp53標的遺伝子であり、これを介して癌遺伝子Aktを抑制することで発がんを抑制する。PHLDA3は肺・膵神経内分泌腫瘍の発症抑制に関与していることが明らかになったが、その検討の際、PHLDA3の抑制により、膵臓内の膵ランゲルハンス島(膵島：血糖のコントロールに関与)が過形成を起こし、通常に比べ大きく、またその内容はベータ細胞(インスリンの分泌に関与)のみが増殖していることが明らかになった。この結果は、PHLDA3の操作により膵島の機能が通常よりも向上されることを示唆するものであり、膵島を移植することで血糖の是正を図る糖尿病の細胞治療：膵島移植に応用できるのではないかと考えられた。そこでわれわれは、PHLDA3ノックアウトマウス(以降KO)より膵島を分離・確保し、糖尿病マウスに移植することで、野生型のマウス(以降WT)の膵島に比べ膵島移植の効果が向上するか検討を進めている。

【0037】

・PHLDA3 KO膵島の肝臓内移植の治療効果

臨床における膵島移植は門脈を介して肝臓に生着させる肝臓内移植が主流である。まず、肝臓内膵島移植におけるPHLDA3 KO膵島の治療効果をWT膵島移植群と比較することで検討した。移植膵島は150であるが、これは血糖値を正常化させるために必要最低限の膵島数(マージナルドナー数)を下回る(我々の検討では、肝臓内膵島移植に必要なマージナルドナー数は200-300膵島である)。図5A. 肝臓内膵島移植後の糖尿病マウスの血糖推移を示す。移植後56日までの評価であるが、PHLDA3 KO膵島移植群はWT膵島移植群に比べ、特に移植後42以降劇的に血糖が改善した。図5B. KO膵島移植群において血糖が正常化(200mg/dL以下)したマウスも多く、WTが10%であったのに対し、KOは42%であった(有意差はなし)。図5C. グルコース溶液を腹腔内投与した後の経時的な血糖推移(糖負荷試験)を示す。縦軸は血糖値の時間経過の積(血糖変化面積：GTT-AUC)であるが、KO群で有意に低値であった。これはKOにおける糖負荷後の血糖変化がWTに比べ低値で経過したことを示す。図5D. 移植後の血清インスリン値の変化を示す。これも有意差はないものの、KOはWTに比べ高値であった。移植後の基礎血清インスリン値に上昇傾向がみられ、KO移植群における耐糖能の改善につながったものと考えられた。図5E. 移植後56日にマウスより肝臓を摘出し、標本観察を行い、生着した膵島の数を比較した。WT群では膵島の生着が見られないものが多かったのに対し、KO群ではほとんどのサンプルに膵島が確認できた。有意差こそないが、KO群で多くの膵島が生着している傾向が認められた。

【0038】

以上より、肝臓内移植の系でKO群に優れた耐糖能の改善効果が認められた。肝臓内移植は門脈、すなわち血管内の移植であるため、膵島の脱落の原因となる急性の凝固反応や、膵島そのものが末梢血管を塞栓するために起こる虚血が誘導され過酷な移植環境であると考えられている。今回の結果より、PHLDA3 KO膵島はこれらの条件、すなわち急性ストレ

スに対する抵抗性があると考えられる。PHLDA3の操作により、肝臓内膵島移植の移植効果が劇的に改善される可能性が示唆された。

【産業上の利用可能性】

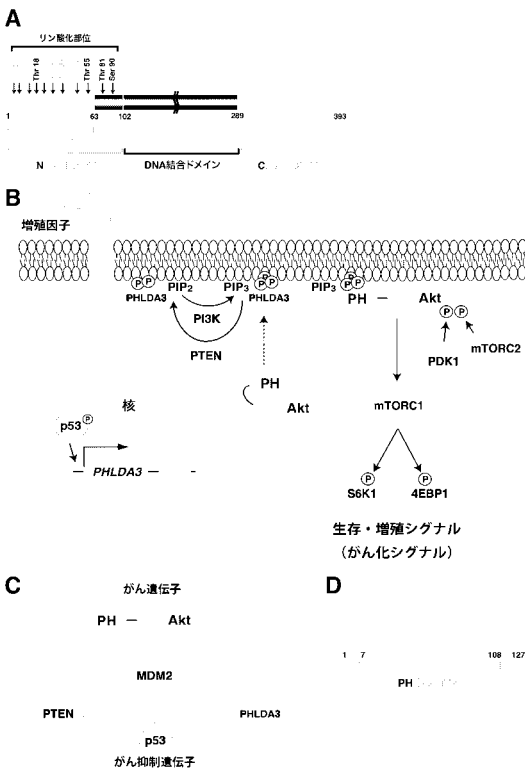
【0039】

1型糖尿病患者数については、年齢別に、子供の1型糖尿病は世界的に急増、世界の15歳以下の1型糖尿病の子供の数は49万5100人、15~25歳の患者数はこれ以上であり、さらには25才以上の人も含めると総患者数は何百万人存在する。若い人では血糖管理が比較的容易であるが、30才台以降の人では管理が難しく、膵島移植を希望する人が多い。現在、膵島移植は、全世界で年間数十例の患者に行われている。

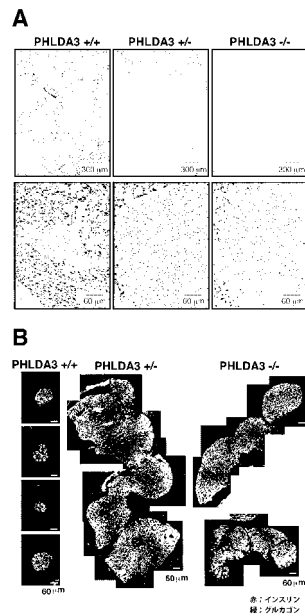
【0040】

PHLDA3発現を抑制した膵島やPHLDA3遺伝子欠損ブタから得られる膵島は移植後の生着率が高く糖尿病治療に非常に有効である。さらにはPHLDA3低分子阻害剤が開発されれば、膵島頑強化・増幅・移植成績向上も可能であり、2型糖尿病における膵島細胞の機能低下を遅延もしくは抑制できる。

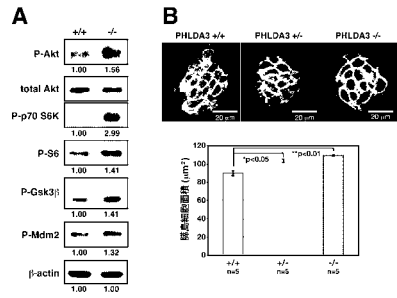
【図1】



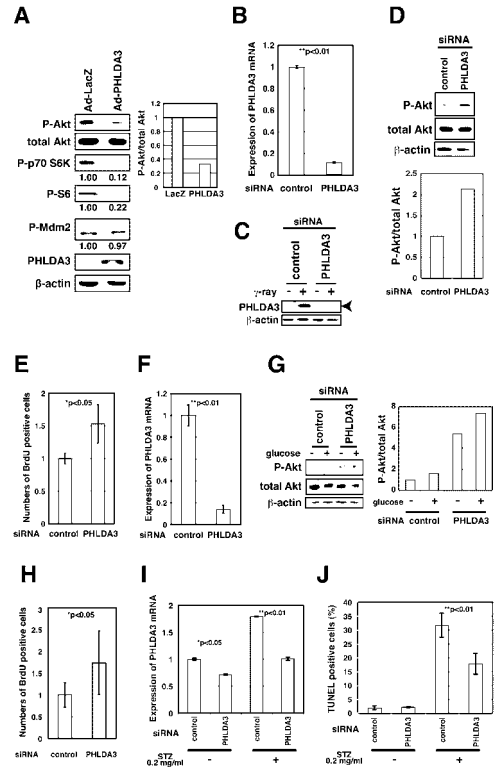
【図2】



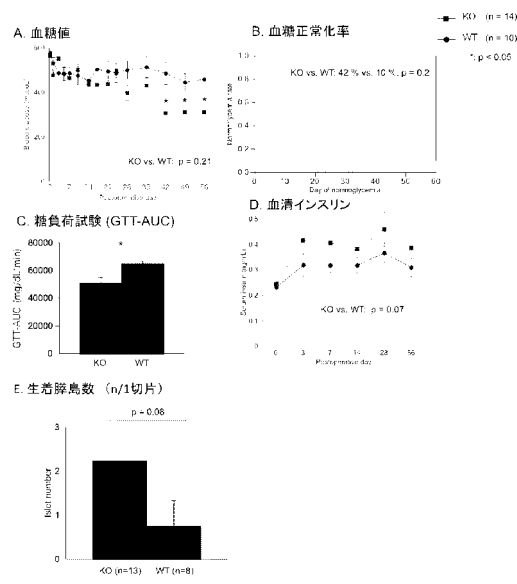
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【手続補正書】

【提出日】平成28年4月15日(2016.4.15)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

臓器もしくは組織の細胞を含む移植材料の調製方法であって、前記細胞がPHLDA3の発現抑制下の細胞から構成され、前記細胞のジェノタイプがPHLDA3(+/-)であることを特徴とする、移植材料の調製方法。

【請求項2】

前記移植材料が腎臓、肝臓、肺、心臓、小腸、膵臓または膵島の移植材料である、請求項1に記載の移植材料の調製方法。

【請求項3】

(削除)

【請求項4】

移植材料の調製をPHLDA3の発現又は機能を抑制する物質の作用下に行うことを特徴とする請求項1、2、17のいずれか1項に記載の移植材料の調製方法。

【請求項5】

PHLDA3の発現抑制剤がPHLDA3のsiRNAであり、PHLDA3のsiRNAを細胞内に導入して移植材料の調製を行う、請求項4に記載の移植材料の調製方法。

【請求項6】

(削除)

【請求項7】

細胞が生体適合性のカプセルに封入されている、請求項1、2、4、5、17のいずれかに記載の移植材料の調製方法。

【請求項8】

臓器又は組織の細胞から構成される移植材料であって、細胞のジェノタイプがPHLDA3(-/-)またはPHLDA3(+/-)であり、移植材料が膵島である、移植材料。

【請求項9】

非ヒト哺乳動物由来である請求項8に記載の移植材料。

【請求項10】

細胞のジェノタイプがPHLDA3(+/-)である、請求項8又は9に記載の移植材料。

【請求項11】

PHLDA3抑制剤を含む糖尿病治療薬。

【請求項12】

PHLDA3プロモーターの制御下にレポーター遺伝子を含む発現ベクターを導入した細胞に候補物質を作用させ、レポーター遺伝子の発現量を低下させる候補物質を選択することを特徴とする、糖尿病治療薬のスクリーニング方法。

【請求項13】

PHLDA3の発現又は機能を抑制する物質を有効成分とする移植効率向上剤。

【請求項14】

前記移植材料が膵島の移植材料である、請求項1に記載の移植材料の調製方法。

【請求項15】

(削除)

【請求項16】

MEN1の機能を保持している請求項8に記載の移植材料。

【請求項 17】

移植材料を構成する細胞が M E N 1 の機能を保持している、請求項 1 又は 2 に記載の移植材料の調製方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2015/064792
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61L27/00(2006.01)i, A61K9/48(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)n According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61L27/00, A61K9/48, A61K31/7088, A61K45/00, A61P3/10, C12Q1/02, C12N5/10 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2015 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Kozue SAITO et al., "Akt Yokusei Idenshi PHLDA3 wa Sui β Saibo no Zoshoku o Yokusei suru", Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan Program Yoshishu, 20 November 2013 (20.11.2013), vol.36th, 1P-0874	<u>1-9, 11-13</u> 10
A	WO 2010/087497 A1 (Japan Health Sciences Foundation), 05 August 2010 (05.08.2010), example 6 (Family: none)	1-13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 August 2015 (17.08.15)		Date of mailing of the international search report 25 August 2015 (25.08.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/064792

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2009/026317 A2 (SENESCO TECHNOLOGIES, INC.), 26 February 2009 (26.02.2009), claim 1 & JP 2010-536379 A & US 2009/0093434 A1 & EP 2195429 A & AU 2008288988 A & CA 2700463 A & CN 102124108 A & KR 10-2010-0046266 A & IL 204072 D	1-13

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 6 4 7 9 2	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61L27/00(2006.01)i, A61K9/48(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)n			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61L27/00, A61K9/48, A61K31/7088, A61K45/00, A61P3/10, C12Q1/02, C12N5/10			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2015年 日本国実用新案登録公報 1996-2015年 日本国登録実用新案公報 1994-2015年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII) CAplus/ MEDLINE/EMBASE/BIOSIS /WPIDS (STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X A	齋藤梢他, Akt 抑制遺伝子 PHLDA3 は隣β細胞の増殖を抑制する, 日本分子生物学会年会プログラム・要旨集, 2013. 11. 20, Vol. 36th, 1P-0874	1-9, 11-13 10	
A	W0 2010/087497 A1 (財団法人ヒューマンサイエンス振興財団) 2010.08.05, 実施例6 (ファミリーなし)	1-13	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 17. 08. 2015		国際調査報告の発送日 25. 08. 2015	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 深草 亜子	4U 9548 電話番号 03-3581-1101 内線 3439

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 6 4 7 9 2
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2009/026317 A2 (SENECO TECHNOLOGIES, INC.) 2009.02.26, 請求項 1 & JP 2010-536379 A & US 2009/0093434 A1 & EP 2195429 A & AU 2008288988 A & CA 2700463 A & CN 102124108 A & KR 10-2010-0046266 A & IL 204072 D	1-13

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 35/38 (2015.01)	A 6 1 K 35/38	4 C 0 8 6
A 6 1 K 35/39 (2015.01)	A 6 1 K 35/39	4 C 0 8 7
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 9/48 (2006.01)	A 6 1 K 9/48	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00	G
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 Q 1/06 (2006.01)	C 1 2 Q 1/06	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N 5/071	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72) 発明者 大木 理恵子

東京都中央区築地五丁目1番1号 国立がん研究センター研究所内

(72) 発明者 坂田 直昭

宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内

Fターム(参考) 4B063 QA08 QA20 QQ02 QQ42 QQ52 QR36 QS25 QS34 QX02
 4B065 AA90X BA01 CA44
 4C076 AA53 BB32 CC50 FF21 FF65
 4C081 AB11 BA12 CD34 DA16
 4C084 AA17 MA70 NA05 NA13 NA14 ZC351 ZC352
 4C086 AA02 EA16 MA01 MA04 NA05 NA13 NA14 ZC35
 4C087 AA02 AA04 AA05 BB41 BB47 BB50 BB51 BB52 BB55 CA04
 MA37 MA67 NA05 NA13 ZC35

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。